

海水より分離した寒天分解菌について

日高富男・鮫島宗雄

Studies on the Agar-decomposing Bacteria Isolated from Sea-water

Tomio HIDAOKA and Muneo SAMESIMA

緒 言

微生物による寒天分解現象は種々の寒天分解菌に関する記載には見られるが、寒天分解酵素に関する報告は比較的少い。該酵素に関する従来の研究を見ると、GRAN¹⁾(1902)は *Bac. glaticus* に、大島²⁾(1931)はエゾアワビ内臓に、森³⁾(1939)がサザエの消化管に各々その存在を認めて居る。更に最近門田⁴⁾(1951)は *Vibrio purpureus* より粗酵素液を調製して該酵素の一般性質を明かにし、石松⁵⁾(1952)は *Vibrio agarliquefaciens* について酵素と培養条件の関係について報告して居る。著者等はアサクサノリの磯焼現象を追及中その葉体表面よりの分離菌7株中2株の寒天分解菌(Bact-5及びBact-7と仮称)を認めた。これらの寒天分解菌につきその性状性質即ち発育及び液化に対する最適培養条件を調べ、更に粗酵素液を調製しその一般性質を研究したのでその結果を報告する。

実 験 の 部

I. 分離菌の性状

1) Bact-5

形態学的性質：短桿状、先端は円形、 $0.8\sim 1.0\mu \times 1.0\sim 1.6\mu$ ($0.8\mu \times 1.2\mu$)。4 μ 内外の単極毛を具え活潑に運動す。孢子を形成せず、GRAM 陰性。

培養上の性質：(25°C, 7日間培養)

肉汁寒天平面—発育中庸、直径約4mmの類円形、湿光を有し不透明黄褐色を呈す。表面は褶襞状で隆起し周縁は波状。

肉汁寒天劃線—発育中庸、刺棘状、菌苔は膜状で固く粘性がある。平面培養と共に聚落発生後5日目から菌苔の周辺より寒天を溶解し始め溝を作るが、寒天液化物の増加は著しくない。

肉汁寒天穿刺—発育貧弱にして液化も認められず。

Gelatin 穿刺—発育せず。

肉汁—僅かに一様な濁濁。液表の発育は環状、少量の黄白色膜状沈澱を生ず。

牛乳—変化なし。

馬鈴薯—発育せず。

生理的性質：硝酸塩を亜硝酸塩に還元するが微弱であり、H₂S, NH₃は生産せず。

炭素源—Glucose, Sucrose, Lactose を利用するが酸又は Gas を形成せず、Starch, Cellulose は利用しない。寒天を液化し還元糖を生産するが蒟蒻—Mannan に対しては液

化のみを認む。

窒素源— NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Peptone, Asparagine, Aspartic acid を利用するが Urea は利用しない。

遊離酸素に対する性質—好気性。

分離源：1952 年 4 月鹿児島市の養殖海苔。

特性：寒天を液化分解し還元糖を生産する。

2) Bact-7

形態学的性質：長桿状，先端は円形，やや彎曲せる細胞を混在す。0.6~0.8 μ ×4.0~8.0 μ (0.8 μ ×6.4 μ)。2~3 μ の周毛を具し緩慢なる運動性を有す。胞子を形成せず，GRAM 陰性。

培養上の性質：(25°C, 7日間培養)

肉汁寒天平面—発育中庸，直径 5 mm 程度の類円形で湿光を有し不透明橙黄色。発育初期には帯紅色の，3~5 日後には帯緑色の螢光を有す。表面平滑，扁平で周縁は全縁。

肉汁寒天劃線—発育中庸，刺棘状で菌苔の質は牛酪様。平面培養と共に聚落発生後 2 日目から菌苔周辺より寒天を溶解し始め溝を作る。液化物は寒天の溶解に伴い増加する。

肉汁寒天穿刺—発育貧弱にして液化も認められず。

Gelatin 穿刺—殆んど発育せず。

肉汁—濁濁中等で均質，液表発育は薄膜状で，少量の黄白色膜状沈澱を生ず。

牛乳—変化なし。

馬鈴薯—発育せず。

生理的性質： NH_3 の生産を見るが微量であり，硝酸塩還元性及び H_2S の生産はない。

其他の性質は Bact-5 に同じ。

特性：寒天を液化分解し還元糖を生産する。又発育初期に菌苔は螢光を有する。

分離源：1952 年 4 月鹿児島市の養殖海苔。

3) 類縁関係

分離菌 Bact-5 は *Flavobacterium* に，Bact-7 は *Pseudomonas* に属せしむべきものと思われる⁶⁾。

II. 培養条件の決定

次にこれらの菌の発育及び寒天液化作用に対する最適培養条件を検索した。

実験方法：この実験では炭素源として寒天のみを使用することとしたので，Sucrose を除いた次の様な修正 CZAPEK 培養基を基本培養液とし，上記の目的に応じて夫々次の如く組成を変えた培養液を調製して実験した。

基本培養液の組成

NaNO_3	3.0 g
K_2HPO_4	1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
KCl	0.1
NaCl	25.0
Agar-agar	2.0 or 23.0
H_2O	1000.0

1) 窒素源の種類

基本培養液に於ける NaNO_3 3.0 g を $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.35 g, Peptone 3.13 g, Urea 1.07 g, Asparagine 2.67 g で置換えた5種の培養液を調製し、各窒素化合物の価値を比較した。何れの場合も窒素含量は 0.05% である。

2) pH の影響

HCl 或は NaOH を用いて前記基本培養液の pH 値を夫々 5.8, 7.0, 7.4, 8.6, 9.6 とし、pH の影響を観察した。

3) 食塩濃度の影響

この実験を行うために次の組成を有する基本人工海水培養液を調製し、更に食塩を加えてその濃度を夫々 0.5%, 3.0%, 10%, 20% とした。

MgCl_2	5.0 g
MgSO_4	2.6
CaSO_4	1.0
KCl	0.7
Agar-agar	2.0 or 23.0
H_2O	1000.0

以上の各培養基に於て寒天濃度 2.3% のものは菌の発育状態観察用として供試菌の劃線培養を行い、0.2% のものは寒天液化試験用とした。即ち此の場合は大型試験管に 9 cc 宛分注し常法により時々振盪しつつ培養を行つた後 100° に 10 分間加熱して残余の寒天を溶解し、その 6 cc を用い OSTWALD 粘度計により 50° に於て粘度を測定した。培養は 25° で 7 日間行つたが別に培養温度の影響を見るために前記修正 CZAPEK 基本培養液を用いて 20°, 30°, 35°C の各温度に培養実験した。

此等各実験の結果は第 1, 2 表及び第 1, 2, 3 図に示した通りである。

Table 1. Influence of cultural conditions on the bacterial growth. (cultured for 7 days at 25°C, + : degree of growth)

	Bact. No.	5	7
a. N-source	NaNO_3	卅	卅
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	+	+
	Peptone	卅	卅
	Urea	—	—
	Asparagine	卅	卅
b. Temp.	20°C	卅	+
	25°	卅	卅
	30°	卅	+
	35°	+	+
c. pH	5.8	卅	卅
	7.0	卅	卅
	7.4	卅	卅
	8.6	卅	卅
	9.6	—	—
d. NaCl conc.	0 %	—	—
	0.5	卅	卅
	3.0	卅	卅
	10.	+	+
	20.	—	—

Table 1. a に示したように発育に対する窒素源は Peptone が最も良く、 NaNO_3 がこれに次ぎ Asparagine も亦良好であるが $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Urea は劣つて居た。液化は Table-2 の如く NaNO_3 が最も良い結果を示した。有機窒素源を用いたものは培養中粒状沈澱を生じたため測定値が不規則となり明確な結果が得られなかつた。しかし劃線培養中の寒天液化を見ると Peptone は NaNO_3 に劣らず強力であつた。以上の結果いずれの供試菌の場合も発育に対しては Peptone 及び NaNO_3 , 寒天液化に対しては NaNO_3 が窒素源として好適である事が分つた。

発育に対する最適温度は Table 1. b の如く 25°C 附近にあり、液化に対する最適温度は Fig 1 に見られる如く Bact-5 は 25°C, Bact-7 は 25°~30°C 附近にある。

Table 2. Effect of nitrogen source on the agar-liquefying activity of bacteria 5 and 7. (cultured for 7 days at 25°C)

Nitrogen source	Vr	
	Bact. 5	Bact. 7
NaNO ₃	50.0	42.9
(NH ₄) ₂ SO ₄	64.4	57.1
Peptone	85.7	57.1
Urea	85.7	71.4
Aspragine	71.4	50.0

この様に両菌共発育と液化に対する適温がほぼ等しいことから見て、菌の発育と酵素生産は大体並行して行われることが分る。

pH の影響は Table 1. c の如く発育は両菌共 7.0 ~ 7.4 に於て最も良好であるが、液化は Fig 2 に見られる様にやや酸性に偏し 5.8 ~ 7.0 の間に最適 pH が存在するものようである。

次に Table 1. d によると発育に対する最適食塩濃度は明かに 3% 前後に存し、液化も Fig 3 に示す様に 3% 附近の濃度が最良で海水細菌としての性質の一端を示しているものと思われる。

Ⅲ. 培養時間の経過による培養基粘度の変化

次に以上の実験によつて明かにされた寒天液化に対する最適諸条件下に培養を行い、培養時間の経過による液化の進行状態を実験した。

前記の液体寒天培養基 70 cc づつを 300 cc 容フラスコに分注殺菌し、同組成の培養基に 7 日間培養した各菌を 5 白金耳づつ接種し、時々振盪しつつ 25°C で培養した。この培養液から所定時間後に毎回 6 cc づつピペットでとり、これについて粘度測定を行い相対粘度を算出した。その結果は Fig 4 に示した。これによると接種後 48 時間までは急激に液化

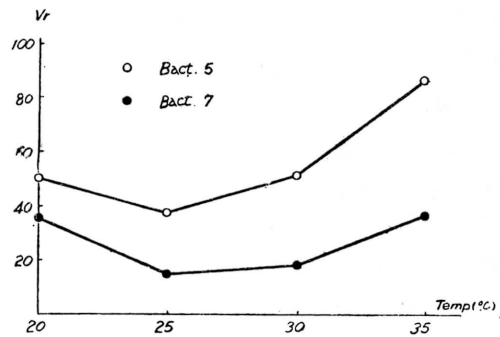


Fig 1. Effect of temperature on the agar-liquefying activity of bacteria-5 and 7.

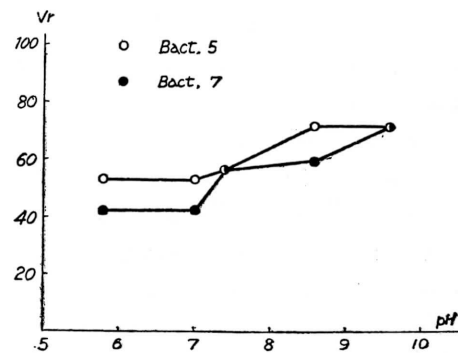


Fig 2. Effect of pH on the agar-liquefying activity of bacteria 5 and 7.

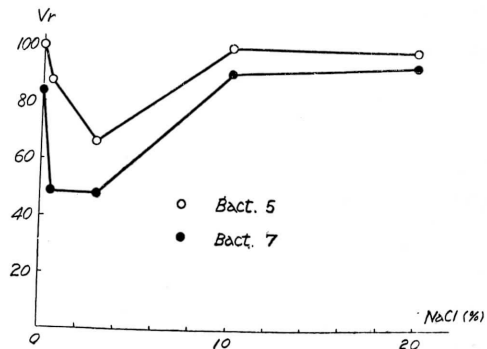


Fig 3. Effect of NaCl on the agar-liquefying activity of bacteria 5 and 7.

$$Vr = \frac{R.V. \text{ of inoculated medium} - R.V. \text{ of water}}{R.V. \text{ of control medium} - R.V. \text{ of water}} \times 100$$

R.V. ... Relative viscosity

が進行しているが113時間内外で液化の進行が止り酵素の生産又は作用も停止させられるものと考えられる。

Ⅲ. 粗酵素液の最適作用条件

実験Ⅱ及びⅢにより寒天液化に対する最適培養条件を知つたので其の結果を参照して粗酵素液を調製し、酵素作用に及ぼすpH及び温度の影響を寒天液化の程度により検索し、更に粗酵素液による寒天分解経過を、寒天の液化と還元糖の生成量を測定することにより追及した。

実験Ⅲに用いたと同一組成の培養基 100 cc づつを 300 cc 容フラスコに分注殺菌し、又これと同一培養基に 25°C、120 時間培養した菌を 1 cc づつ接種し時々振盪しつつ 25°C、96 時間培養後 REICHEL 細菌濾過器で濾過した。かくして両者共其の培養液より約 150 cc の濾液を取り、これに 5 cc づつの Chloroform 及び Toluol を加え粗酵素液とし以下の実験に供した。

1) 酵素作用に及ぼす pH の影響

基質として 0.2% 寒天水溶液 5 cc を大型試験管に分注し、それらに pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, に調整した磷酸塩緩衝液各 2 cc 及び粗酵素液 1 cc 宛を加え、40°C の恒温水槽に 4 時間放置した後 100°C に 10 分間加熱し酵素作用を停止させると共に残余の寒天を溶解せしめ、粘度を測定した。なお対照試験として同一組成試料を粗酵素液注加後直ちに 100°C 10 分間加熱したものを他の試料と同様に処理したが、粘度の変化は認められなかつた。以上の実験の結果では pH 6.0 が寒天液化に対する最適条件であることが分つたが pH 5.2 から 6.8 までの間を 5.2, 5.6, 6.0, 6.4, 6.8 と細分し同法で再測定を行つた。Fig 5 はこれらの実験の結果を示したものである。但し後者の場合基質として 0.4% 寒天溶液を用いた。図に見られるように pH 5.6 附近に最適 pH 条件の存在する事が分る。

2) 酵素作用に及ぼす温度の影響

前項1)と同じ方法で実験したが緩衝液は pH 6.0 のものを用い、20°, 30°, 40°, 50°C の各温度に調節した恒温水槽に 4 時間保つた。対照試験も同様に行つたが粘度変化はこの場合も起らなかつた。

Fig. 6 はその実験成績で最適温度は 40°C 附近にあることが分る。

3) 粗酵素液による寒天分解経過

0.2% 寒天水溶液 500 cc を 1 l 容フラスコに入れて基質とし、これに pH 5.6 の磷酸塩緩衝液 200 cc と粗酵素液 100 cc を加え、直ちに 40°C 恒温水槽に浸漬し所定時間

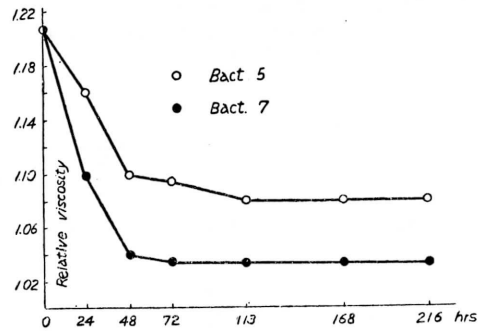


Fig 4. The liquefying process of agar-agar by the agar-decomposing bacteria (No.5 and 7)

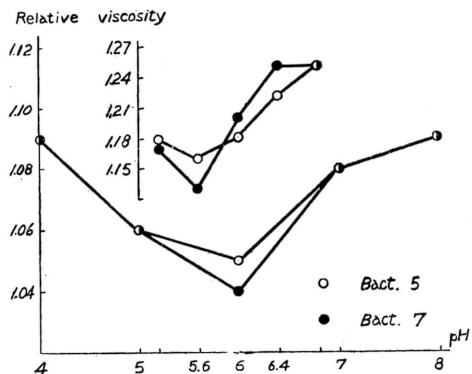


Fig 5. Effect of pH value on the activity of the crude agar-liquefying enzyme.

後に相対粘度を測定し、一方 0, 3, 7, 24 時間後に反応液 100 cc づつをとり生成還元糖を BERTLAND 法により定量し Galactose として算出した。

Fig. 7 はこの結果を示したものであるが液化は反応開始後 3~5 時間でほぼ最高に達するが、還元糖の生成は液化より数時間遅れ而も緩慢に行われる事がわかる。本実験では還元糖の生成が微弱であつたが、その原因としては、条件を液化に対して好適状態におくことに留意し、還元糖生成条件を考慮しなかつた事及び、当時菌の活力が低下して居た事が挙げられる。予備実験の際得られた結果では 1% 寒天溶液を基質とした場合、生成還元糖は Galactose として 100 cc 中 Bact-5 は 40.6 mg (対照 18.1), Bact-7 は 116 mg (対照 27.8) であつた。

要 約

著者等はアサクサノリ葉体表面より 2 株の寒天分解菌を分離し、それらの発育と寒天液化に対する最適培養条件を検索し、次いで該菌培養液より粗酵素液を調製して、その一般的性質を研究し次の結果を得た。

1) 分離菌は細菌学的性質より検索した結果それぞれ *Flavobacterium* (Bact-5) 及び *Pseudomonas* (Bact-7) に属して居た。両菌の最適発育条件は互に類似し、次にその主なるものを列挙すれば、窒素源…Peptone 又は NaNO_3 , 温度…25°C, pH…7.0~7.4, 食塩濃度…3% で、又寒天液化に対する最適培養条件は、窒素源… NaNO_3 , 温度…25°~30°C, pH…5.8~7.0, 食塩濃度…0.5~3%, であり、液化現象は菌接種後約 113 時間で最高に達した。

2) 粗酵素液の寒天液化作用に及ぼす pH と温度の影響を粘度測定により観察した結果、pH 5.6, 40°C に於て最も強力な作用を示した。更に寒天分解経過を見ると、液化現象は反応開始後 3~5 時間でほぼ平衡状態に達するが、還元糖の生成はそれより数時間遅れ 緩慢に行われる事が分つた。

終りに本研究を行うに当り 終始御指導を賜わつた恩師吉村貞彦先生、並びにこの発表に際し多大の御配慮御後援を頂きました柏田教授其他諸先生に謝意を表する。

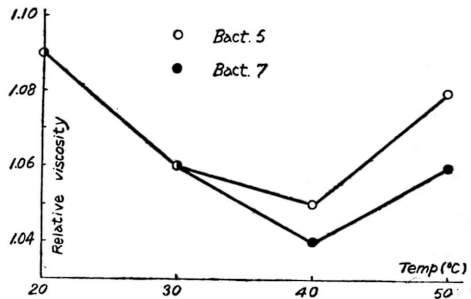


Fig 6. Effect of temperature on the activity of the agar-liquefying enzyme.

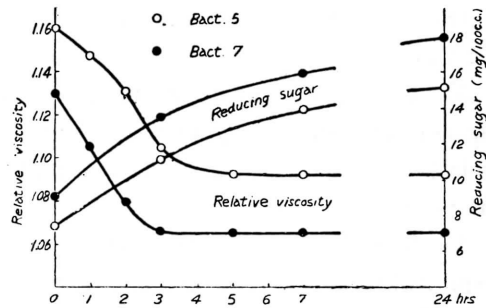


Fig 7. The decomposing process of agar-agar by the crude agar-liquefying enzyme.

Résumé

The authors isolated two strains of agar-decomposing bacteria from the surface of *Porphyra tenera*, and studied on the optimum conditions to the growth and agar-liquefying capacity of these bacteria, and the general properties of crude agar-decomposing enzyme prepared from the bacterial culture, was also examined. And the following results were obtained.

1) The isolated bacteria Bact-5 and Bact-7 seemed to be a sort of *Flavobacterium* and *Pseudomonas*, respectively.

2) Agar-liquefying by these bacteria was accomplished utmostly under following conditions,—at 25°~30°C; in the medium containing 3% of NaCl and NaNO₃ as nitrogen source; pH 5.8~7.0. And the activity reached to the maximum state at about 113 hours.

3) The effects of pH value and temperature on the activity of the crude agar-decomposing enzyme were studied by measuring the decreasing rate of relative viscosity of agar solution, and the most powerful activity was shown at pH 5.6 and 40°C.

4) Liquefaction of agar-agar by the crude enzyme reached to the state of equilibrium between 3~5 hours from beginning of the action, but production of reducing sugar was late for a long hours.

文 献

- 1) Gran : Bergens Museum Aarbog., 14 (1902); Zentbl. Bakt. II Abt., 75, 330 (1928)
- 2) 大島 : 農化., 7, 328 (1931)
- 3) 森 : 農化., 15, 1070 (1939)
- 4) 門田 : 日水誌., 16, 575 (1951)
- 5) 石松 : 醸工誌., 30, 472 (1952)
同上 : 同上 31, 1 (1953)
- 6) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 5th Ed. (1939)